Spitalul Clinic de Boli Infecţioase
"Sf.Parascheva„ Iaşi
Laboratorul de analize medicale
IASI, Str.Octav Botez Nr 2

PROCEDURA SPECIFICA

DETERMINARI IMUNOLOGICE

COD: PSL – I3- 01

Editia 1, Revizia 0

Din data de 01.05.2013

APROBAT
Manager General
Prof. Dr. Carmen Dorobăţ

VERIFICAT
Manager Tehnic
Dr. Rodica Fântânaru

Elaborat:
Responsabil analiza
Dr. Cristina Mirela Petrovici

DIFUZAT IN REGIM CONTROLAT
EXEMPLAR Nr.

Avertisment : Documentul de fata este proprietatea Spitalului Clinic de Boli Infecţioase "Sf.Parascheva„ Iaşi - Laboratorul de analize medicale. Reproducerea si difuzarea documentului sunt in exclusivitate dreptul laboratorului.

Scanned with OKEN Scanner

LISTA DE DIFUZARE / RETRAGERE

Locul difuzării	Primit				Retras			
	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură	Nr. ex.	Data	Nume	Semnătură
RC	0.	01.05.2013	As.Lorena Zaborila					
Manager Tehnic	1.	01.05.2013	Dr. Rodica Fântânaru					
Sef Compartiment	2.	01.05.2013	Dr. Cristina Mirela Petrovici					
Responsabil analiza	3.	01.05.2013	Dr. Cristina Mirela Petrovici					

Scanned with OKEN Scanner

INDICATORUL REVIZIILOR

Nr. Crt	Data	Editia/ revizia	Identificari modificare Capitol, subcapitol, pagina modificata, continut modificari	Functia si semnatura		
				Elaborat	Verificat	Aprobat

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

0. CUPRINS

CAPITOLUL

1. Scop si domeniul de aplicare
2. Documente de referinta si conexe
3. Definitii si abrevieri
4. Descrierea activitatii

4.1. Condiţii prealabile

4.2. Resurse necesare

4.2.1. Reactivi si materiale furnizate de truse(kituri)

4.2.2 Martori: Pozitiv/Negativ

4.2.3 Alte materiale

4.2.4. Echipamente/dispozitive

4.2.5. Condiţiile de pastrare a reactivilor din truse

4.2.6 Etape preliminare

5. Modul de lucru

5.1 Determinarea H. Pylori

5.2 Detectarea AgHBs

5.3 Detectarea Ac aHCV

5.4 Detectarea anticorpilor anti Leptospira

5.5 Detectarea markerilor imunologici in Mononucleoza infectioasa

5.6 Testul ASLO

5.7 Testul CRP

5.8 Testul FR

5.9 Testul RPR

6. Responsabilitati
7. Inregistrari

Scanned with OKEN Scanner

1. SCOP SI DOMENIU DE APLICARE

Scopul acestei proceduri este de a prezenta modul de organizare si desfasurare a activitatii de incercare, pentru determinarea in vitro markerilor imunologici pentru:

- H. Pylori, Lepospira, Mononucleoza infectioasa, HB, HC, precum si a FR, ASLO, CRP, si RPR in conformitate cu cerintele impuse de metodele de laborator in vigoare.

Se aplica in compartimentul Imunologie I3, al Laboratorului.

2. DOCUMENTE DE REFERINTA

2.1 DOCUMENTE DE REFERINTA

- MCL- 01
- Metode de laborator –Editura medicala 1977

2.2. DOCUMENTE CONEXE

- Prospectele aferente fiecarui kit de reactivi

3. DEFINIŢII ŞI ABREVIERI

LEPTOSPIRA - gen de spirochete subţiri, fine cu spire strânse şi regulate si capetele încârligate, mobile avand o mişcare caracteristică de înşurubare şi flexie; pătrund în organism prin tegumente şi mucoase intacte; poseda antigene de suprafaţă care confera specificitate de grup şi tip; sunt imunogene organismul uman sintetizează anticorpi faţă de antigenele de suprafaţă. Bola cauzata de ele se numeste leptospiroza.

H. PYLORI – *Helicobacter pylori* este o bacterie Gram-negativă, spiralată, flagelată, care se localizează în criptele mucoasei gastrice. Denumirea ei provine de la forma de helix, formă care se pare că este responsabilă de adaptabilitatea si capacitatea de infectare în mediul puternic acid de la nivelul stomacului. Infecţia cu Helicobacter pylori este o cauză majoră de gastrită cronică şi boala ulceroasă; de asemenea studiile epidemiologice efectuate în ultimii ani au confirmat asocierea infecţiei persistente cu un risc crescut de apariţie a cancerului gastric. În plus, această bacterie este responsabilă pentru majoritatea cazurilor de limfoame (forme de neoplazii hematologice, caracterizate prin proliferarea celulelor din ţesutul limfoid asociat mucoasei digestive.

MONONUCLEOZA INFECTIOASA – numita si "boala sarutului", este cauzata de virusul Epstein-Barr (EBV) este un virus herpetic limfotrop cu răspândire ubicuitară, care infectează aproximativ 95% din populaţie, până la vârsta adultă. O infectie EBV primara este definita serologic prin aparitia precoce a anticorpilor VCA IgM (imediat dupa debutul

clinic) care ating un nivel maxim la 2 saptamani, urmata de scaderea progresiva a acestora pana la niveluri nedetectabile. Aproape simultan se produce o crestere a anticorpilor VCA IgG. Majoritatea pacientilor cu mononucleoza infectioasa prezinta la prima testare niveluri crescute de anticorpi VCA IgG si IgM. In timp ce VCA IgM dispar in 2-3 luni de la debutul bolii, VCA IgG persista indefinit la persoanele sanatoase. Mai exista o categorie de anticorpi IgG indreptati impotriva antigenului nuclear EBV (EBNA) care apar in circulatie dupa cateva saptamani sau luni de la debutul bolii si persista timp indelungat sau chiar toata viata. La pacientii cu infectie asimptomatica detectarea EBNA IgG impreuna cu anticorpii VCA IgG si IgM este utila in diferentierea stadiului precoce de convalescenta de faza acuta a mononucleozei infectioase.

AgHBs –Antigen de suprafata al virusului hepatitei B (AgHBs) este un component al invelisului extern al virionului B. Persoanele infectate prezinta in sange pe langa particulele virale infectante si alte particule mai mici, neinfectioase care contin de asemenea AgHBs. Determinantul antigenic impotriva caruia se declanseaza raspunsul imun este comun tuturor particulelor de AgHBs.
Detectarea AgHBs in ser indica prezenta infectiei cu virusul hepatitei B. AgHBs este primul marker imunologic al infectiei, fiind prezent in ser cu cateva saptamani inainte de debutul clinic al bolii (al icterului). AgHBs ramane detectabil o perioada de 1-4 luni in cursul unei infectii acute, dupa care se negativeaza. Daca AgHBs persista mai mult de 6 luni, se considera ca infectia s-a cronicizat[1;3]. Aproximativ 5-10% din adulti si 90% din nou-nascuti nu pot elimina virusul dupa infectie si devin purtatori cronici de AgHBs. O treime din pacientii purtatori de AgHBs dezvolta hepatita cronica care in timp poate evolua spre ciroza hepatica si, in unele cazuri, spre carcinom hepatocelular

AcāHCV – Antigenul central al VHB, Ag HBc, care nu se gaseste in sange ci numai in celulele hepatice infectate determina aparitia anticorpilor anti-HBc,care apar in sange destul de timpuriu, inaintea anti-HBs, avand valoare diagnostic
Anticorpii anti-HBc devin aproape intotdeauna detectabili in perioada de incubatie a bolii. Dupa disparitia antigenului HBs si inainte de aparitia anticorpilor anti-HBs (" fereastra imunologica "), anticorpii anti-HBc si anticorpii anti-HBc-IgM , pot fi singurii indicatori ai prezentei hepatitei B acute.
Datorita persistentei anticorpilor anti-HBc (de obicei o perioada lunga dupa infectare), detectarea acestor anticorpi este utila in scop epidemiologic, pentru a constata prevalenta infectiei cu VHB in anumite grupe de populatie.
Titrul anticorpilor anti-HBc determinat la purtatorii sanatosi de antigen HBs este in medie de 10 ori mai mare fata de cel depistat la pacientii cu hepatita acuta B, in timp ce la pacientii cu hepatita cronica B este in medie de 100 de ori mai mare. Un titru foarte ridicat de anticorpi anti-HBc chiar si la persoanele cu Ag HBs negativ, sugereaza prezenta hepatitei cronice B (infectie cu VHB criptica).

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

ASLO – anticorpi antistreptolizina O. Este un tip de anticorpi care neutralizeaza streptolizina (toxina streptococica); antistreptolizina O apare in sange dupa afectiuni streptococice. La pacientii infectati, streptolizina O actioneaza ca un antigen fata de care organismul dezvolta un raspuns umoral specific (antistreptolizina O sau ASLO). Nivelurile anticorpilor devin detectabile in 1-2 saptamani de la infectia streptococica si ating un maximum dupa 3-6 saptamani; daca nivelurile ridicate persista dupa 6 saptamani sau chiar se inregistreaza o crestere a acestora se va suspecta o reinfectie. Pozitivitatea testului, confirma expunerea la streptolizina streptococica, fiind utila pentru diagnosticul infectiilor streptococice: angina streptococica, reumatismul articular acut, glomerulonefrita, endocardita, scarlatina si in monitorizarea regulata a pacientilor cu reumatism articular acut (la interval de 2-4 saptamani).

CRP – proteina C reactiva.Este un reactant de faza acuta care creste rapid, dar nespecific, ca raspuns la leziuni tisulare si inflamatie, fiind un indicator mai sensibil si mai prompt decat VSH. El se leaga de reziduurile de fosforil-colina ale multor fosfolipide si in special ale polizaharidului C pneumococic (de unde ii provine si numele), de cromatina si histone, avand rol in clearance-ul detritusurilor celulare, este un factor major de opsonizare, se leaga de fagocite si accelereaza fagocitarea antigenelor si microorganismelor; de fractiunea C1q a complementului, determinand activarea complementului pe calea clasica, de lipoproteinele LDL si detine probabil un rol in indepartarea acestora de la nivelul placii aterosclerotice.
CRP este un declansator proinflamator in sine deoarece stimuleaza productia monocitara de Interleukina-1, Interleukina-6 si TNF-α (factor de necroza tumoral). Desi principala sursa de CRP este ficatul, date recente indica faptul ca tesutul arterial poate produce atat CRP cat si proteine apartinand sistemului complementului. Nivelul CRP poate inregistra cresteri foarte mari (de 100 ori sau chiar mai mult) dupa traumatisme severe, infectii bacteriene, inflamatii, interventii chirurgicale sau proliferari neoplazice.

FR - Factorii reumatoizi sunt un grup heterogen de autoanticorpi fata de determinantii antigenici ai regiunii Fc a moleculelor de IgG, care formeaza complexe IgG-anti-IgG in circulatie sau in lichidul sinovial. De obicei sunt anticorpi de tip IgM, dar pot fi si de tip IgG sau IgA. Nivelul seric al factorului reumatoid este crescut in peste 70% din cazurile de poliartrita reumatoida, avand un rol important in producerea manifestarilor extraarticulare. Factorul reumatoid precede debutul bolii uneori cu mai multi ani. In prezenta sa, riscul de aparitie a artritei reumatoide este de 5-40 de ori mai mare decat la persoanele seronegative.Nu este implicat in initierea procesului inflamator care cauzeaza artrita reumatoida, dar probabil determina perpetuarea si amplificarea acestuia.In functie de prezenta sau absenta factorului reumatoid, poliartrita reumatoida este clasificata in 2 categorii: seropozitiva sau seronegativa. Pacientii seropozitivi au un risc mai mare decat cei seronegativi de a dezvolta artrita eroziva cu impotenta functionala articulara si

manifestari extraarticulare cum ar fi: noduli reumatoizi, determinare pulmonara de boala, vasculita, sindrom Felty (neutropenie si splenomegalie asociate cu artrita reumatoida), polineuropatie, serozite si sindrom Sjögren secundar.
Factorul reumatoid nu este specific pentru poliartrita reumatoida, fiind intalnit si in alte boli ale tesutului conjunctiv, precum si in infectii cronice (endocardita, tuberculoza, hepatita B). Unii factori reumatoizi se pot comporta ca proteine care precipita la frig (crioglobuline) Testul este util in diagnosticul diferential si prognosticul afectiunilor inflamatorii articulare (artrite),test screening util in cazul in care se suspecteaza crioglobulinemie mixta tip II sau sindrom Sjögren; monitorizarea seriala a pacientilor cu sindrom Sjögren (disparitia factorului reumatoid poate fi un semnal pentru debutul unui limfom).

RPR - (reagin plasma response) este un test test netreponemic (nespecific) de floculare, macroscopic, folosit pentru depistarea serologica calitativa si semicantitativa a sifilisului.Totuşi, organismul nu produce întotdeauna anticorpi ca răspuns la activitatea acestei bacterii aşa că testul nu este întotdeauna exact. Testul este cel mai concludent în fazele secundare şi latente, când, cel mai probabil, este pozitiv. În timpul fazei primare şi terţiare acest test poate, în mod eronat, să dea rezultat negativ, fiind necesare alte teste înainte de excluderea diagnosticului de sifilis. O valoare pozitivă a testului indică prezenţa sifilisului. Rezultatul pozitiv trebuie confirmat prin teste treponemice de exempluTPHA – Treponema pallidum Haemagglutination Assay – (hemaglutinare pasiva – detecteaza anticorpi totali IgG si IgM).

4. DESCRIEREA ACTIVITATII

4.1. Condiţii prealabile

Temperatura camerei de lucru trebuie sa fie +23+29^{0}C. Procedura nu se executa pana cand temperatura nu se incadreaza intre aceste limite, deoarece rezultatele testelor pot fi influentate.
Fiecare nou lot de truse trebuie evaluat comparativ cu lotul anterior, antigenul testandu-se cu martorii de ser din trusa si cu alte seruri de control de reactivitate cunoscuta. Daca se obtin rezultate discrepante (diferente mai mari de o dilutie in testul cantitativ paralel), lotul nou se respinge.
Aparatele si dispozitivele necesare executarii procedurii trebuie sa fie in stare de buna functionare.
Probele de testat trebuie sa corespunda din punct de vedere cantitativ (min. 0.5ml) si calitativ. Nu se testeaza probe hemolizate, lipemice, contaminate bacterian/fungic, probe de plasma pastrate mai mult de 48h, probe de ser pastrate mai mult de 5 zile la+ 2+8^0 C. Nu se testeaza probe de LCR.
Personalul desemnat sa execute testarile trebuie sa aiba calificarea/experienta necesara.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

4.2. Resurse necesare

4.2.1. Reactivi si materiale furnizate de truse(kituri)

4.2.2 Martori: Pozitiv livrat cu kiturile (ASLO, RPR, FR,CRP)

4.2.3 Alte materiale:

- Solutie salina fiziologica (0.9% NaCl) pentru tehnica semicantitativa
- Vas cu dezinfectant (sol. hipoclorit de sodiu 0.5-1%)
- Hartie de filtru
- Manusi latex

4.2.4. Echipamente/dispozitive

- Agitator rotativ mecanic in plan orizontal ,cu 20mm diametru de rotatie, reglat la 100 rpm
- Ceas de semnalizare (timer)
- Termometru de camera
- Pipeta automata 20-200 µl, conuri de prelevare galbene
- Centrifuga de masa pentru centrifugarea probelor

4.2.5. Condiţiile de pastrare a reactivilor din truse

Reactivii din trusa raman stabili pana la data expirarii (marcata pe ambalaj si etichete), daca se pastreaza corespunzator (+ 2+8^{0}C). NU se ingheata.

4.2.6 Etape preliminare

Se verifica temperatura camerei de lucru (+23+29^{0}C) .
Se pregateste spatiul de lucru pentru executarea procedurii si asigurarea masurilor de biosecuritate:
- se elibereaza locul de obiectele care nu sunt necesare,
- se aduc stative potrivite, hartie de filtru, vasul cu dezinfectant ,pentru conuri de prelevare folosite

Se scot reactivii si probele din frigider si se lasa in repaos la temperatura de lucru 30min.
Se verifica starea de functionare a echipamentelor utilizate pentru efectuarea testului si anume:
- numarul de rotatii/min ale agitatorului rotativ care trebuie sa fie 100 rpm (se numara rotatiile 15 sec x 4)
- centrifuga de masa, functional

Scanned with OKEN Scanner

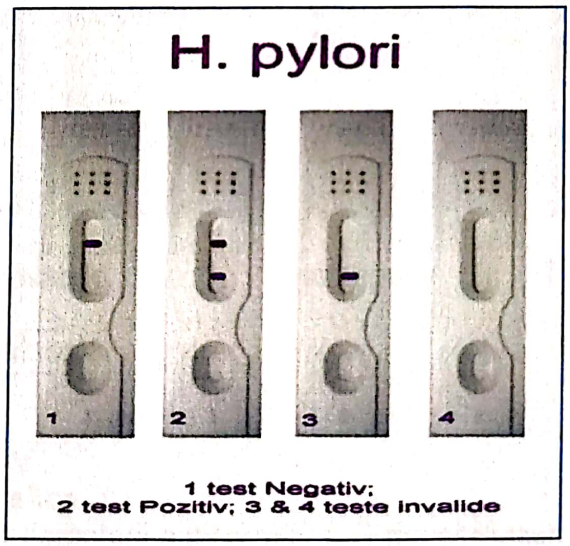
5. MODUL DE LUCRU

5.1 Detectarea anticorpilor anti- H. Pylori
Metoda imunocromatografica

Este un test rapid, destinat determinarii calitative a anticorpilor anti-Helicobacter Pylori tip IgG. Pentru producerea lui au fost utilizate antigene recombinante purificate cu inalta specificitate. Este test rapid (max. 20 min.) destinat uzului profesional. Casetele sunt de unica utilizare.

In caseta de lucru se pun 40 µl ser de cercetat, apoi 3-4 picaturi diluant. Interpretarea rezultatului se face in decurs de 1-5 minute astfel:

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire
- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului



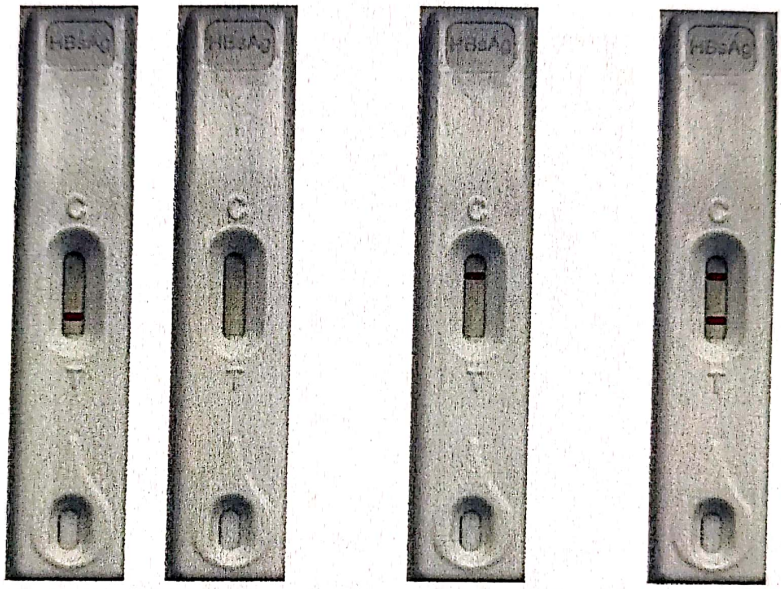
Valoare de referinta: Negativ

5.2 Detectarea AgHBs
Metoda imunocromatografica

Este un test rapid destinat determinarii calitative a antigenului HBs. Anticorpii monoclonali sunt imobilizati in aria de testare "T", iar anticorpii IgG antisoarece, sunt imobilizati in aria de control "C".Anticorpii monoclonali HBs prin conjugare cu particule coloidale de aur dau un compus colorat in nuante de roz/rosu. In caseta de lucru se introduc 3 picaturi (100µl) ser de cercetat, fara a patrunde bule de aer; interpretarea testului se face in 5-15 minute; nu se interpreteaza dupa 20 minute.

Scanned with OKEN Scanner

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire
- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului.



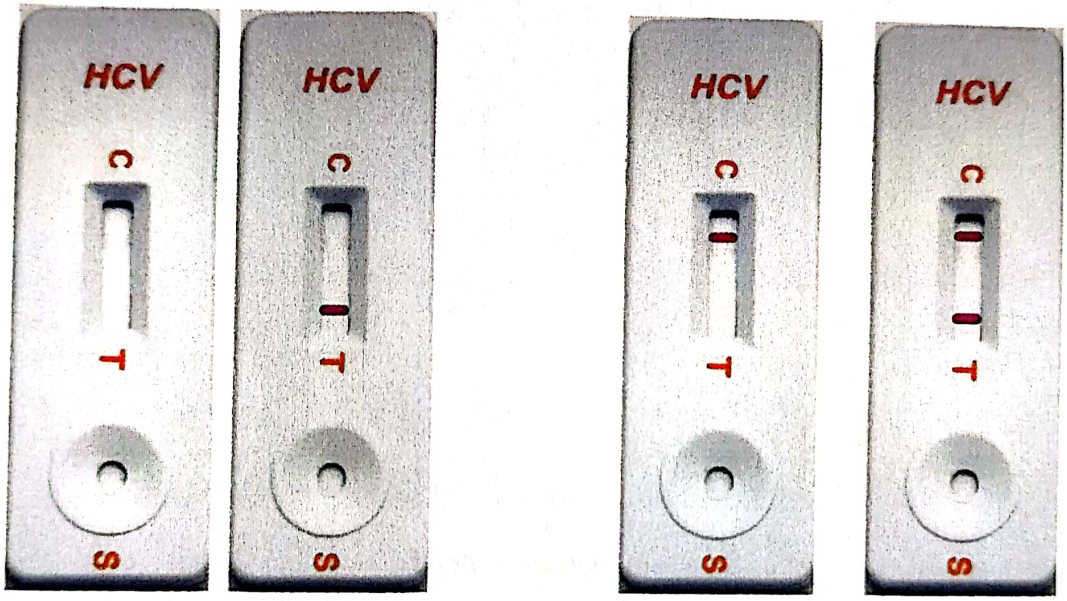
Teste invalide Test negativ Test pozitiv

Valoare de referinta: Negativ

5.3 Determinarea Ac āHCV
Metoda imunocromatografica

Este un test rapid destinat detectarii anticorpilor IgG din ser/plasma.Anticorpii IgG prezenti in proba biologica, leaga Proteina A conjugata cu aur coloidal, formeaza un complex IgG-Proteina A-aur coloidal, care migreaza prin capilaritate de-a lungul benzii fiind capturat de antigenii specifici predepusi in zona liniei T si vor forma o linie visinie de intensitate variabila, indicand un rezultat pozitiv al testului.In zona liniei C, membrana nitrocelulozica este acoperita cu IgG de capra anti iepure iar imunocomplexul de conjugat anti iepure IgG iepure-aur coloidal, va da o linie de culoare visinie , care este linia de control ce trebuie sa apara obligatoriu ca testul sa fie valid. In caseta de lucru se introduc 5 µl de ser si 2 picaturi solutie buffer, astfel incat sa un patrunda bule de aer. Rezultatul se citeste in 15 minute in functie de concentratia de anticorpi ; linia colorata din aria de testare poate apare in 2 minute, in cazul in care exista dubii la 15 minute, se poate prelungii citirea pana la 30 minute, nu mai mult de atat.

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire
- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului



Teste invalide Test negativ Test pozitiv

Valoare de referinta: Negativ

5.4 Detectarea anticorpilor anti Leptospira
Metoda imunocromatografica

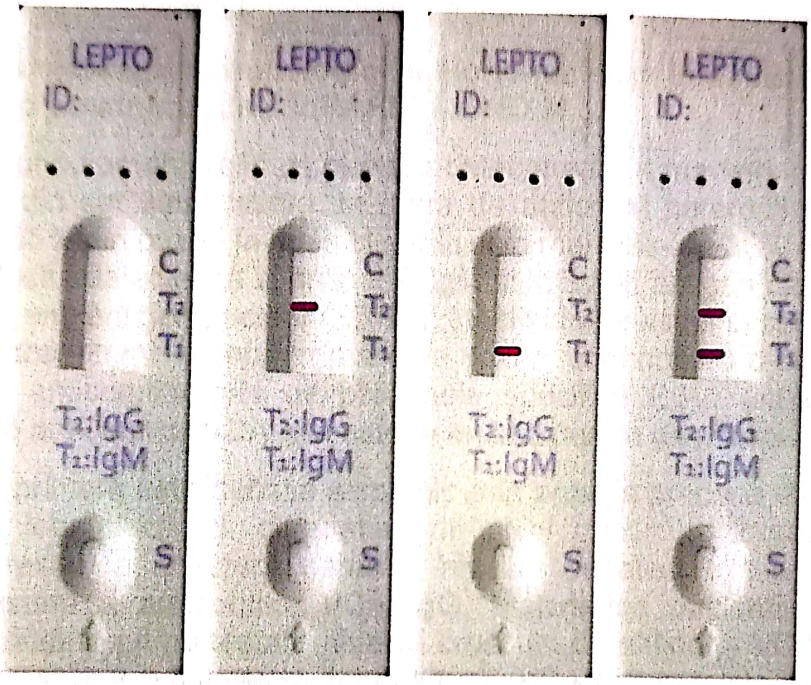
Este un test rapid care detecteaza si diferentiaza simultan anticorpii IgM si IgG la Leptospira interrogans, din ser sau plasma. Testul contine 2 benzi T1 si T2 precum si o banda de control C. Banda T1 contine reactivi ce pun in evidenta anticorpi IgM anti Leptospira interrogans, banda T2 contine reactivi care pun in evidenta anticorpi IgG anti Leptospira interrogans, iar banda C contine IgG de capra anti iepure.In caseta de lucru se introduc 2-3 (60-90 µl) picaturi ser de cercetat si o picatura ser fiziologic sau solutie tampon. Rezultatul se citeste in 10 minute dar nu peste acest interval de timp. Pozitivarea se petrece in mai putin de 2 minute.

- rezultat negativ – este dat de prezenta unei singure linii roz in zona de control a ferestrei de citire
- rezultat pozitiv – este dat de prezenta a doua linii roz in fereastra de citire (linie de control si o linie in dreptul zonei T1 sau T2)

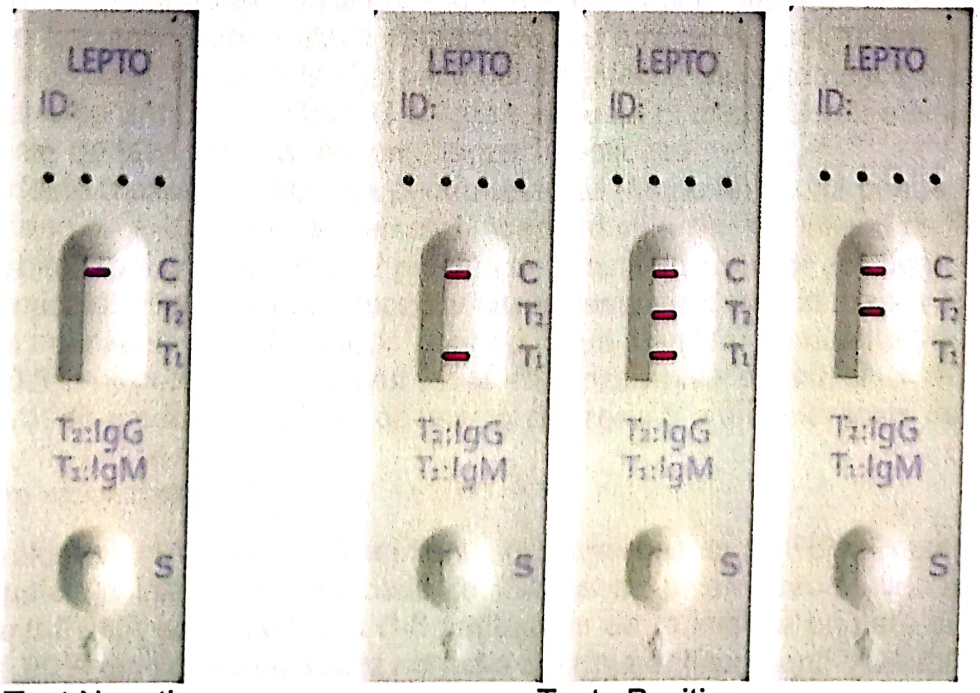
Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

- rezultat invalid – in absenta oricarei linii. Se impune repetarea testului



Teste invalide



Test Negativ

Teste Pozitive

Scanned with OKEN Scanner

Valoare de referinta: Negativ

5.5 Detectarea markerilor imunologici in Mononucleoza infectioasa
Metoda imunocromatografica – VIRAPID MONO M &G

Este un test imunocromatografic ce permite detectarea a 4 markeri imunologici ai virusului Epstein –Barr, din ser sau plasma. In afara de anticorpii heterofili Paul-Bunnell (PBHA) prezenti in 80-85% din cazuri la tineri si adulti si in mai putin de 35% din cazuri la copii mai mici de 4 ani, testul detecteaza si anticorpii IgM si IgG anti antigen capsidar viral (VCA) cat si anticorpii IgG anti antigen nuclear (EBNA), stabilindu-se astfel si stadiul bolii. Anticorpii heterofili fiind absenti intr-un numar mare de cazuri, confirmarea diagnosticului se face pe baza depistarii anticorpilor fata de proteinele specifice EBV: antigenul capsidei virale (VCA), prezenta anticorpilor VCA IgM este esentiala pentru diagnosticul infectiei acute.

O infectie EBV primara este definita serologic prin aparitia precoce a anticorpilor VCA IgM (imediat dupa debutul clinic) care ating un nivel maxim la 2 saptamani, urmata de scaderea progresiva a acestora pana la niveluri nedetectabile. Aproape simultan se produce o crestere a anticorpilor VCA IgG. Majoritatea pacientilor cu mononucleoza infectioasa prezinta la prima testare niveluri crescute de anticorpi VCA IgG si IgM. In timp ce VCA IgM dispar in 2-3 luni de la debutul bolii, VCA IgG persista indefinit la persoanele sanatoase.

Mai exista o categorie de anticorpi IgG indreptati impotriva antigenului nuclear EBV (EBNA) care apar in circulatie dupa cateva saptamani sau luni de la debutul bolii si persista timp indelungat sau chiar toata viata. La pacientii cu infectie asimptomatica detectarea EBNA IgG impreuna cu anticorpii VCA IgG si IgM este utila in diferentierea stadiului precoce de convalescenta de faza acuta a mononucleozei infectioase.
Testul folodeste o caseta dubla una pentru testul M (Mono M) si una pentru testul G (Mono G) ; se introduc cate 40 µl ser de cercetat incepand cu testul M , lasand ca fiecare picatura sa fie absorbita, apoi imediat , cate 2 picaturi de reactiv (developer solution), tinand flaconul in pozitie verticala. Interpretarea respectiv citirea testului se face in maxim 30 minute, prin compararea intensitatii culorilor liniilor aparute cu un standard de nuante (de la „0" = S negativ la „0,5" = S pozitiv nivel scazut , „1,2"= S pozitiv nivel mediu, si „3" = S pozitiv nivel crescut) livrat de producator. Liniile de control din zona C a ambelor teste trebuie sa apara ca testele sa fie valide.
Interpretarea rezultatelor

Prezenta anticorpilor VCA IgM indica infectie primara recenta cu EBV. Prezenta anticorpilor VCA IgG indica o infectie in antecedente, fara a se putea preciza vechimea acesteia. Anticorpii anti-EBNA se dezvolta la 6-8 saptamani de la infectia primara si persista toata viata. Peste 90% din populatia adulta normala prezinta anticorpi anti-VCA IgG si anti-EBNA IgG.

VCA IgG	VCA-IgM	EBNA IgG	Interpretare
-	-	-	Absenta expunerii
+	+	-	Infectie recenta
+	-	+	Infectie in antecedente
+	-	-	Infectie recenta*
+	+	+	Infectie in antecente

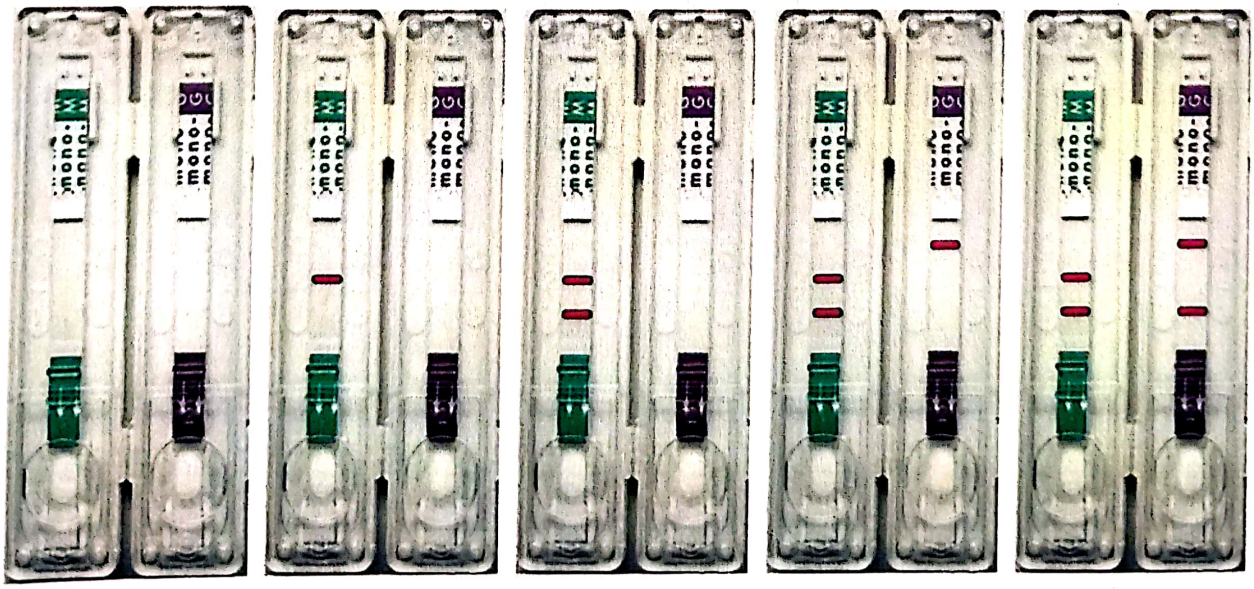
*Nu poate fi precizat cu certitudine momentul infectiei (recenta sau veche) deoarece 5-10% dintre pacienti nu dezvolta deloc anticorpi anti-EBNA

Limite si interferente

Anticorpii VCA IgM pot fi depistati uneori in titru mic in absenta unei infectii recente confirmate (de exemplu, infectie EBV cronica-activa)[3].

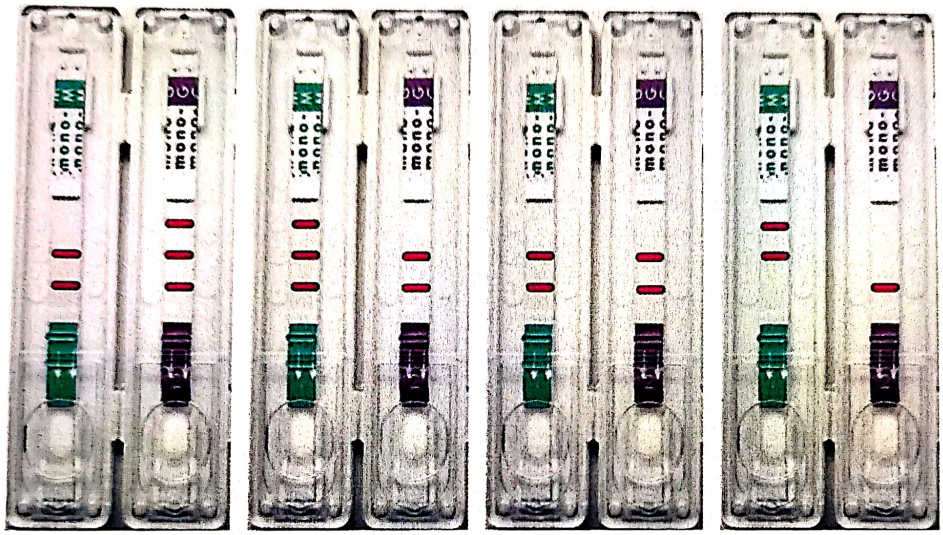
Momentul aparitiei anticorpilor anti-VCA si EBNA sufera mari variatii individuale.

Performanta testului nu este stabilita pentru pacientii imunodeprimati, nou-nascuti sau probele de sange de cordon ombilical; de asemenea nu este stabilita pentru diagnosticul carcinomului nazofaringian, limfomului Burkitt sau a altor limfoame asociate cu EBV.

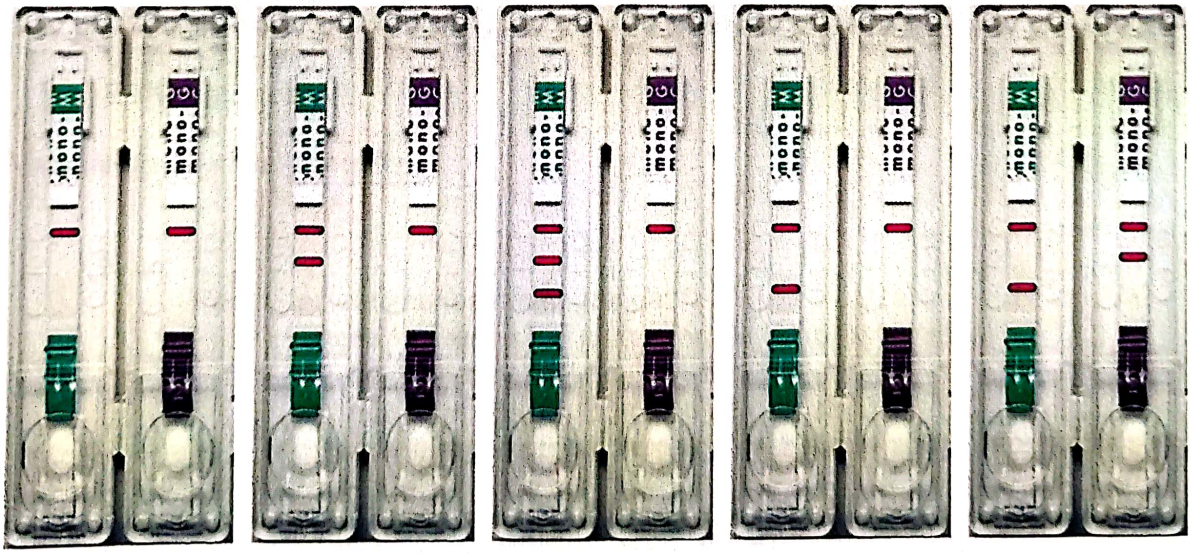


Teste invalide (lipsa liniei de control la unul din teste invalideaza rezultatul)

Scanned with OKEN Scanner



Teste invalide (lipsa liniei de control la unul din teste invalideaza rezultatul)



Test Negativ

Test Pozitiv
PBHA-pozitiv

Test Pozitiv
PBHA-pozitiv
VCA IgM-pozitiv

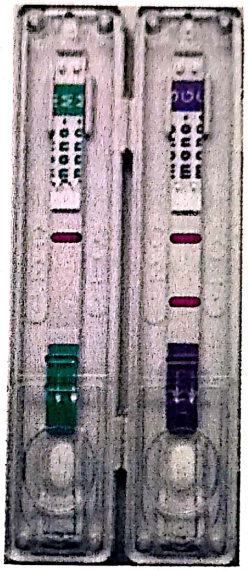
Test Pozitiv
VCA IgM-pozitiv

Test Pozitiv
VCA IgM-pozitiv
VCA IgG-pozitiv

Scanned with OKEN Scanner

Test pozitiv
VCA IgM-pozitiv
VCA IgG-pozitiv
EBNA IgG-pozitiv

Test pozitiv
VCA IgG-pozitiv
EBNA IgG-pozitiv



Test pozitiv
EBNA IgG-pozitiv

Valoare de referinta: Negativ

Note:

Pentru testele imunocromatografice:

- Nu se folosesc kituri cu termen de valabilitate depasit
- Nu se folosesc casete cu invelisul deteriorat
- Kiturile si probele biologice nu se congeleaza
- Nu se folosesc probe biologice intens hemolizate, hiperlipemice sau contaminate bacterian
- Testele se executa in 2-3 ore de la prelevare sau in 24 de ore de la prelevare, in acest timp fiind mentinute la frigider la 4-8°C
- Rezultatul pozitiv trebuie confirmat, in anumite situatii , prin alte metode de exemplu ELISA.

5.6 Testul ASLO
Metoda : Latex aglutinare

Scanned with OKEN Scanner

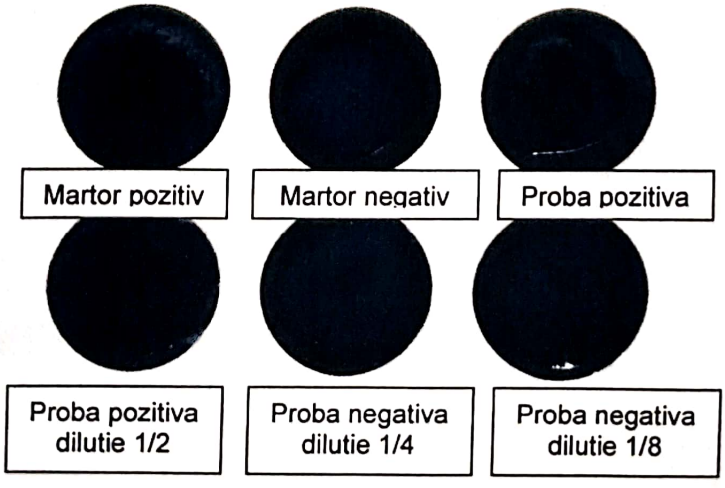
Se realizeaza cu ajutorul kitului ASLO LATEX. Este un test direct de aglutinare pe card Reactivul care face parte din kit, contine particule de latex invelite cu streptolizina O purificata. Aceasta reactioneaza cu anticorpii prezenti in serul pacientilor si aglutineaza.

a) Testul calitativ: pe o placuta se pipeteaza o picatura de ser, peste care se pune o picatura de reactiv. Se omogenizeaza cu capatul plat al baghetei din trusa. Se agita placuta imprimand acesteia o miscare de rotatie si se citeste rezultatul in timp de doua minute. In caz de reactie pozitiva se observa aparitia glutinatelor macroscopice. Aglutinarea arata un nivel al ASLO de minim 200 UI/ml. Absenta glutinarii demonstreaza absenta anticorpilor anti-streptolizina O.

b)Testul semicantitativ: se efectueaza dilutii succesive ale probei cu urmatoarele rapoarte de dilutie: 1/2,1/3,1/4 etc. Ca diluent se poate folosi serul fiziologic. Se testeaza fiecare dilutie in parte prin procedeul descris la pct. A. Nivelul aproximativ al anticorpilor poate fi exprimat inmultind cel mai mare factor de dilutie pentru care se mai obtine reactie pozitiva de aglutinare cu 200 UI/ml (sensibilitatea reactivului).

Limite si interferente

- Titrul ASLO poate fi crescut si la unii purtatori sanatosi de streptococ betahemolitic grup A
- Numai 25% dintre pacientii cu streptococie cutanata au titrul ASLO crescut. La acesti pacienti se recomanda determinarea anticorpilor anti-DNAaza
- Tratamentul antimicrobian suprima raspunsul umoral fata de streptolizina O, de aceea testul nu este indicat la pacientii care au primit recent antibiotice.
- b-lipoproteinele din serul pacientilor cu boli hepatice neutralizeaza proprietatile hemolitice ale streptolizinei O, determinand obtinerea de rezultate fals crescute.
- In cazul specimenelor de ser contaminate cu Bacillus cereus sau Pseudomonas, b-lipoproteinele existente in produsii de crestere bacterieni neutralizeaza proprietatile hemolitice ale streptolizinei O, determinand obtinerea de rezultate fals crescute.
- In cazuri foarte rare, prezenta gamapatiei monoclonale, in special IgM (macroglobulinemia Waldenström) poate determina rezultate eronate



Testul ASLO

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

Exprimarea rezultatelor:

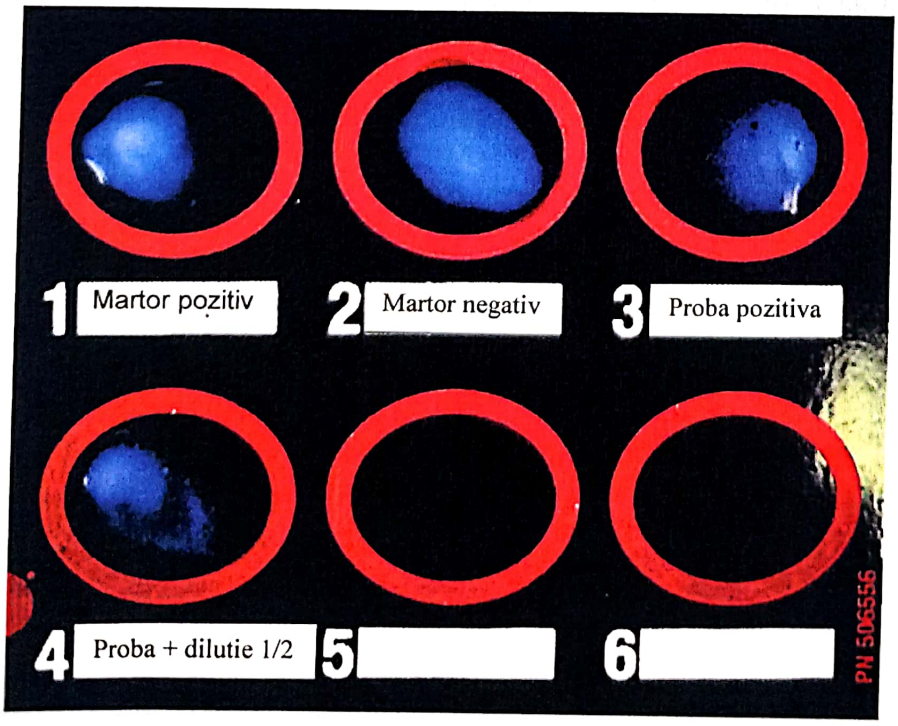
- lipsa aglutinarii vizibile in 2 minute – ASLO < 200 UI /ml
- aglutinare vizibila aparuta in mai putin de 2 minute la o dilutie cunoscuta – ASLO este dat de valoarea obtinuta din inmultirea celui mai mare factor de dilutie pentru care se mai obtine reactie pozitiva de aglutinare cu 200 UI/ml (≥ 200 UI/ml)

Valoare de referinta: < 200 UI/ml

5.7 Test CRP

Metoda latex aglutinare

Testul CRP (test calitativ si semicantitaiv tip latex) se bazeaza pe reactia imunologica dintre anticorpii fata de proteina C-reactiva legati pe particulele inerte de tip latex si CRP din proba pacientului. Cand reactivul este amestecat cu serul care contine cel putin 6 mg/l CRP dupa maxim 2 minute apar aglutinatele, iar reactia va fi considerata ca fiind pozitiva. Reactivul poate fi utilizat si pentru determinarea semicantitativa a CRP. In acest scop se fac dilutii seriale, iar fiecare dilutie este testata calitativ. Concentratia CRP poate fi estimata ca ultima dilutie cu aglutinate vizibile.



Testul CRP

Exprimarea rezultatelor:

- lipsa aglutinarii vizibile in 2 minute – CRP < 6 mg /l
- aglutinare vizibila aparuta in mai putin de 2 minute la o dilutie cunoscuta – CRP este dat de valoarea obtinuta din inmultirea celui mai mare factor de dilutie pentru care se mai obtine reactie pozitiva de aglutinare cu 6 mg/l (≥ 6 mg/l)

Valoare de referinta: < 6 mg /l

Limite si interferente

- Factorii reumatoizi din proba pot da aglutinatea reactivului latex.(se retesteaza utilizand o cantitate de 20µl din proba)
- Fenomene de prozona încep de la 80 mg/ml.

5.8 Testul FR
Metoda latex aglutinare

Test calitativ si semicantitativ tip latex, pentru determinarea factorului rheumatoid din serul uman. Reactivul contine particule latex, invelite cu gamma globulina umana. Prezenta FR in serul pacientului in concentratie de 8 UI/ml si peste, provoaca aglutinarea particulelor latex. Reactivul poate fi utilizat si pentru determinarea semicantitativa a FR. In acest scop se fac dilutii seriale, iar fiecare dilutie este testata calitativ. Concentratia FR poate fi estimata ca ultima dilutie cu aglutinate vizibile.

Rezultate:

- Rezultat Pozitiv: o aglutinatinare vizibila a particulelor de latex care apare în intervalul de 3 minute.

Un rezultat pozitiv reprezinta un nivel de Factori Reumatoizi ≥ 10 IU/ml în serul testat.

- Rezultat Negativ : nu apare aglutinare în intervalul de 3 minute.

Un rezultat negativ reprezinta un nivel de Factori Reumatoizi < 10 IU/ml în serul testat.

Test
Semicantitativ

Se va efectua în acela si mod ca i testul calitativ utilizînd probe de ser diluate anterior cu solutie salina (NaCl 9 g/l).

Nivelul aproximativ al Factorilor Reumatoiuzi din serul testat, în Unitati Internationale pe ml, va fi cel corespunzator celei mai mari dilutii cu rezultat pozitiv ; se înmulteste inversul dilut iei cu 10 IU/ml.

Exemplu: Dilutie Citire

1/ 2	+
1/ 4	+
1/ 8	-

RF = 4 x 10 = 40 IU/ml

Scanned with OKEN Scanner

Limite si interferente
•Diagnosticul nu trebuie sa se bazeze pe un singur rezultat pozitiv obtinut la acest test, ci trebuie corelat cu date clinice
•Complexele imune circulante prezente in serul pacientului pot produce rezultate eronate.
•Incidenta rezultatelor pozitive la subiecti aparenti sanatosi este de 3-5%.
•Reactii pozitive pot fi obtinute nu numai in poliartrita reumatoida, dar si in cazuri de mononucleoza infectioasa, hepatita, sifilis.

Valoare de referinta: < 10 UI/ ml

5.9 Test RPR

Test non-treponemic special dezvoltat pentru detectia rapida si semicantitativa , prin aglutinare pe placa a unui grup de reagene plasmatice/anticorpi ai unor componente tisulare produse de catre aproape toti pacientii infectati cu Treponema pallidum. Determinarea se face prin aglutinarea antigenului (asocierea de coplexe lipidice si particule de carbon) in contact cu reagenele prezente in proba de analizat.
Este un test calitativ si semicantitativ.
Executia testului calitativ

- Cu pipeta automata se repartizeaza 50µL proba de testat intr-un cerc de pe card.
- Este inclus obligatoriu si Controlul pozitiv.
- Cu capatul astupat si latit al baghetei se intinde picatura pe toata suprafata cercului (NU trebuie depasita limita cercului). Se arunca bagheta in dezinfectant.
- Se agita usor flaconul de repartizare cu antigen dupa care, tinandu-l in pozitie verticala, se lasa sa cada cateva picaturi in capacul flaconului (pentru eliminarea aerului din ac).
- Apoi, se repartizeaza cate o picatura de antigen in fiecare cerc, peste proba detestat si Controlul pozitiv. NU se amesteca.
- Se recupereaza antigenul din capacul flaconului.
- Card-ul se pune pe agitator, se acopera cu capac (captusit cu hartie de filtru umeda si se agita 8 min la 100rpm.
- Dupa agitare, cardul se roteste si se balanseaza scurt cu mana, pentru a reusi diferentierea rezultatelor minim reactive de cele nonreactive.
- Citirea se face macroscopic sub lumina puternica, notându-se prezenţa (indiferent de grad) sau absenţa agregarii particulelor de carbon, respectiv Reactiv / Nereactiv.

- **rezultat pozitiv**: in centrul cercului de reactie se vad agregate mari (reactie intens pozitiva) sau pe marginea cercului de reactie se vad agregate mici (reactie slab pozitiva)
- **rezultat negativ**: nu se vad agregate. Suprafata de reactie are un aspect omogen-cenusiu.

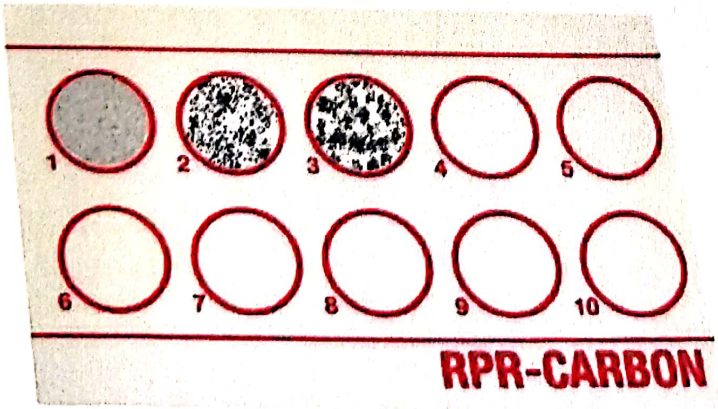
• testul cantitativ: serurile pozitive pot fi notate in functie de intensitatea reactiei. Titrul reactiei este dat de ultima dilutie la care reactia este pozitiva.

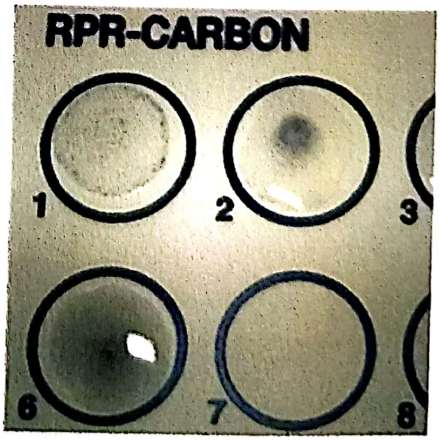
Scanned with OKEN Scanner

Limitele metodei

•Rezultate fals negative pot sa apara in infectii primare recente sau in cazul ultimelor stadii latente ale bolii.
•Rezultate fals pozitive pot sa apara in infectii ca mononucleoza infectioasa, lupus si pneumonie virala.
•Sarcina, consumul de narcotice si bolile autoimmune de asemenea pot prezenta rezultate fals positive
• Rezultatul pozitiv trebuie confirmat prin TPHA
•Testul RPR nu se foloseste pentru LCR.
• Poate sa apara ocazional reactie de prozona. Fenomenul de prozona (inhibitia completa sau partiala a reactivitatii), apare cu serul nediluat; maximum de reactivitate se obtine numai cu serul diluat. Fenomenul de prozona poate fi atat de pronuntat incat in testul calitativ poate sa apara doar un aspect usor grunjos (rough) la un ser, care diluat, are o reactivitate puternica. Toate probele de ser, care la testul RPR calitativ dau o reactie cat de cat grunjoasa, trebuie retestate prin procedura cantitativa.
•Testul RPR poate fi pozitiv la persoane din tari in care sunt endemice sifilisul nevenerian, pinta, pian.
• Ocazional, fata de antigene cardiolipinice pot sa apara reactii biologic fals pozitive , in special la persoane care folosesc droguri; care au boli cum ar fi lupusul eritematos, mononucleoza, lepra, pneumonii virale sau care au fost vaccinate recent.

Valoare de referinta: Negativ





Note:

Pentru testele prin latex aglutinare:

- Nu se folosesc kituri cu termen de valabilitate depasit
- Kiturile si probele biologice nu se congeleaza

Scanned with OKEN Scanner

- Nu se folosesc probe biologice intens hemolizate, hiperlipemice sau contaminate bacterian
- Testele se executa in 2-3 ore de la prelevare sau in 24 de ore de la prelevare, in acest timp fiind mentinute la frigider la 4-8°C
- Inainte de utilizare reactivii latex se omogenizeaza.
- Totdeauna se folosesc martorii Pozitiv si Negativ din kit

6. RESPONSABILITATI INREGISTRARI

Procedura este efectuata de catre MEDIC RESPONSABIL ANALIZA.
Verificarea procedurii este efectuata de catre seful de laborator.

7. INREGISTRARI

Registrul de comenzi interne / externe
Registrul de analiza compartiment Imunologie
Buletin de analiza

Scanned with OKEN Scanner